

Departement für Nutztiere der Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich

Klinik für Fortpflanzungsmedizin
(Direktor: Prof. W. Kähn) und

Swissgenetics Zollikofen
(Direktor: Dr. S. Felder)

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. F. Janett

Beurteilung der Samenqualität von Tiefgefriersperma nach Lagerung im Arbeitscontainer des Besamungstechnikers

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich

Vorgelegt von

Edith Schilter
Tierärztin
von Lauerz SZ

Genehmigt auf Auftrag von
Prof. Dr. R. Thun, Referent
Prof. Dr. Peter Wild, Korreferent

Zürich 2007

Stiftung Zentralstelle Studentendruckerei

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	4
2.1. Samengewinnung und Samenverarbeitung	4
2.1.1. Untersuchung des Ejakulates	4
2.1.2. Samenkonfektionierung	4
2.1.3. Subjektive Bestimmung der Motilität unmittelbar nach der Produktion	5
2.1.4. Objektive Bestimmung der Motilität unmittelbar nach der Produktion	5
2.2. Auslieferung, Handhabung und Rückzug der Samendosen	6
2.3. Bestimmung der Samenqualität nach der Lagerung	7
2.3.1. Objektive Bestimmung der Motilität	7
2.3.2. Flowzytometrische Bestimmung der Akrosomintaktheit	8
2.4. Non-Return-Rate	9
2.5. Statistische Auswertung	10
3. ERGEBNISSE	11
3.1. Einfluss von Region und Ejakulat	11
3.1.1. Samenqualität nach Lagerung in den verschiedenen Regionen	11
3.1.2. Samenqualität der einzelnen Ejakulate	15
3.2. Einfluss des Besamungstechnikers innerhalb der Region	18
3.2.1. Bütschwil	18
3.2.2. Mülligen	21
3.2.3. Neuenburg	24
3.3. Arbeitsweise der Besamungstechniker	27
3.4. Non-Return-Rate	29
3.5. Vergleich zwischen subjektiver und objektiver Motilitätsbestimmung	30

4. DISKUSSION	33
5. ZUSAMMENFASSUNG	37
6. SUMMARY	39
7. LITERATURVERZEICHNIS	41
8. DANK	45
9. LEBENSLAUF	47

1. Einleitung und Fragestellung

Die künstliche Besamung (KB) ist ein wichtiges fortpflanzungstechnisches Verfahren in der heutigen Rinderzucht. In der Schweiz werden zurzeit rund 90% der Rinder und Kühe mit tiefgefrorenem Sperma belegt. Entscheidend für den Besamungserfolg ist neben dem optimalen Besamungszeitraum und der Geschlechtsgesundheit der Kuh auch die Qualität des verwendeten Tiefgefriersamens. Diese wird von zahlreichen Faktoren wie der Qualität des Frischsamens, dem verwendeten Verdünner, der Samenkonzentration, der Einfrier- und Auftaumethode sowie der Handhabung der Dosen während der Lagerung und Übertragung beeinflusst. Die Lagerung von Tiefgefriersamen im flüssigen Stickstoff bei -196°C gilt als Standard in der Rinderbesamung. Dabei kann die Befruchtungsfähigkeit der tiefgefrorenen Samenzellen während Jahrzehnten erhalten bleiben (Braun et al., 1990). So hat Umland (1978) nach einer Samenlagerung von mehr als 6 Jahren und nach Auswertung von 190'000 Erstbesamungen mit 158 verschiedenen Stieren eine NRR 56 Tage nach der Besamung zwischen 69.1 und 75.9 % gefunden. Leibo et al. (1994) verwendeten zur in vitro Befruchtung Samenzellen vom Stier, die seit 37 Jahren tiefgefroren waren und fanden, dass sich von 670 Oozyten 22 % zum 2-Zell-Stadium und 5 % zu normalen Blastocysten entwickelten. Eine aktuelle Studie (Haugan et al., 2007) zeigt hingegen, dass nach einer Samenlagerung von mehr als 5 Jahren die Abkalberate signifikant geringer war als nach einer kürzeren Lagerungszeit.

Für eine Spermischädigung während der Lagerung in flüssigem Stickstoff kommen verschiedenen Ursachen in Frage: genetische Schäden, Abnormalitäten der Chromatinstruktur, Entstehung von reaktivem Sauerstoff durch den Gefrierprozess sowie der Verlust von Spermienoberflächenproteinen (Lessard et al., 2000; Chatterjee and Gagnon, 2001). Schädigungen von Spermien entstehen während des Tiefgefrier- und Auftauprozesses (Bailey et al., 2000; Lessard et al., 2000; Watson P.F., 2000) und sind vorwiegend auf Umkristallisationsvorgänge und den damit verbundenen Veränderungen des osmotischen Druckes zurückzuführen. Auch bei der Entnahme von Samendosen aus dem Container kann es beim Anheben des Kanisters zu Temperaturschwankungen und damit zur Samenzellschädigung kommen (Merkt et al., 1971). Selbst bei -100°C findet die so genannte migratorische Rekristallisation statt, die zwischen -60°C und -10°C am grössten ist

(Luyet 1957). In einem Feldversuch (Arbeiter, 1977) konnte gezeigt werden, dass nach Lagerung der Samendosen im Arbeitsgefäß während der Sommermonate, vermutlich aufgrund der höheren Umgebungstemperaturen, die Qualität des Tiefgefriersamens signifikant schlechter war als nach Lagerung während der Wintermonate. Im Container muss ein Minimum an flüssigem Stickstoff vorhanden sein, damit die Temperatur im Bereich der eingehängten Kanister die kritische Grenze von -120°C nicht übersteigt. Im Hals des Containers herrschen kritische Temperaturverhältnisse: So kann die Temperatur am unteren Halsende bei -180°C liegen, in der Halsmitte die Toleranzgrenze von -120°C klar überschreiten und am oberen Ende beinahe der Umgebungstemperatur entsprechen. Wenn die Dosen wiederholt in diese Temperaturbereiche gebracht werden, kommt es zu Schädigungen des Spermas, die sich kumulieren und den Besamungserfolg herabsetzen können (Kupferschmied, 1983).

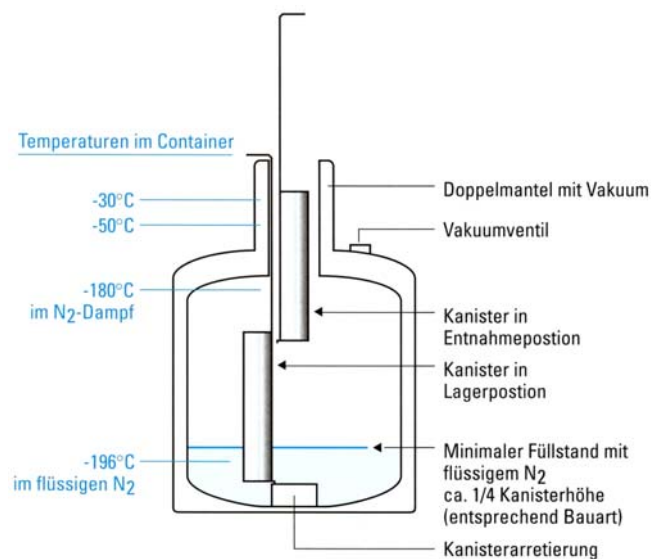


Abbildung 1: Temperaturverhältnisse im Container.

Grundsätzlich wird aufgrund der intensiven Schulung der Besamungstechniker von Swissgenetics davon ausgegangen, dass die Handhabung der Samendosen durch die BT korrekt befolgt wird. Bei einzelnen Besamungstechnikern erweckten der Rückgang der Non-Return-Rate (NRR) und eine reduzierte Samenqualität der

gelagerten Dosen jedoch den Verdacht, dass der Umgang mit den Pailletten in den Arbeitsgefäßen nicht einheitlich erfolgt.

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand deshalb darin, die Auswirkungen der Handhabung von Samendosen durch die Besamungstechniker im Arbeitsgefäß auf die Qualität des Tiefgefriersamens nach Lagerung von 7 Monaten im Feld zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Samengewinnung und Samenverarbeitung

Auf der Besamungsstation Mülligen wurden im Januar 2005 von 7 Stieren im Alter von 3 bis 9 Jahren insgesamt 10 Ejakulate gewonnen und tiefgefroren. Dazu wurden die Stiere regelmässig zwei- bis dreimal in der Woche mittels künstlicher Scheide (Scheideninnentemperatur 40-42°C) abgesamt. Vor der Samengewinnung wurden die Stiere in der Sprunghalle sexuell stimuliert (sog. Leersprünge), wobei der Aufsprung in der Regel am Phantom und nur ausnahmsweise auf einen männlichen Artgenossen als Deckpartner erfolgte. Aus hygienischen Gründen stand für jeden Stier eine eigens gekennzeichnete, sterile künstliche Scheide zur Verfügung. Unmittelbar nach dem Absamen wurde das Spermaröhrchen ins Labor gebracht und bis zur Weiterverarbeitung in ein Wasserbad von 32°C gestellt.

2.1.1. Untersuchung des Ejakulates

Um die Qualität des frisch gewonnenen Ejakulates zu prüfen, wurde es grobsinnlich (Menge, Farbe, Fremdpartikel) sowie mikroskopisch (Massenbewegung, Motilität) untersucht. Zur Bestimmung des Volumens wurde das Ejakulat gewogen und das Ergebnis mit dem Faktor 1.05 (spezifisches Gewicht Stiersamen) multipliziert. Die Bestimmung der Spermiedichte erfolgte mit Hilfe eines Spektrophotometers (PCP 6121, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland). Die Beurteilung der Massenbewegung sowie die Bestimmung der Einzelbewegung, insbesondere der Vorwärtsbeweglichkeit, erfolgten mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops (Axiolab, Carl Zeiss AG, Feldbach, Schweiz) bei 100- bzw. 200facher Vergrößerung. Sämtliche Ejakulate mussten den Qualitätsanforderungen für Frischsamen genügen (Motilität > 70 %, Dichte > 300 000 Spermien/µl) und speziell für diese Studie eine Gesamtspermienzahl von mindestens 10 Milliarden aufweisen.

2.1.2. Samenkonfektionierung

Das frisch gewonnene Ejakulat wurde im Wasserbad bei 32°C mit Triladyl® (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland)-Eigelb im Verhältnis 1:2 verdünnt und während 5 Minuten

stehen gelassen. Anschliessend wurde das vorverdünnte Ejakulat in eine Babyflasche gegeben und bis zur gewünschten Endkonzentration von 80 Millionen Samenzellen/ml (20 Millionen Spermien pro Paillette) mit Verdünner versehen. Die Konfektionierung in 0.25 ml Pailletten und das folgende Aufreckseln wurde bei Raumtemperatur zwischen 18°C und 22°C durchgeführt. Danach fand eine 4stündige Äquilibration bei 4°C im Kühlraum statt. Die computergesteuerte Samengefrierung (Digitcool 5300 3T, IMV, Aîgle, Frankreich) erfolgte von +4°C bis -110°C mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 40°C/min bis -110°C und weiter mit 30°C/min auf -140°C. Die tiefgefrorenen Pailletten wurden anschliessend in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

2.1.3. Subjektive Bestimmung der Motilität unmittelbar nach der Produktion

Zwei Tage nach dem Tiefgefrieren wurden von jedem Ejakulat auf der Station in Mülligen routinemässig je 2 Pailletten bei 37°C während 30 Sekunden im Wasserbad aufgetaut und die Motilität subjektiv unter dem Phasenkontrastmikroskop bei 200facher Vergrösserung geschätzt.

2.1.4. Objektive Bestimmung der Motilität unmittelbar nach der Produktion

Die objektive Bestimmung der Motilität erfolgte im Andrologischen Labor der Klinik für Fortpflanzungsmedizin mittels Computer-assistierter Spermienanalyse (CASA, Hamilton Thorne IVOS, Version 12, Beverly, MA, USA). Für die Messungen fanden die Analyse-Einstellungen für Stiersperma gemäss Vorgabe des Geräteherstellers Anwendung (Tabelle 1). Dazu wurden je 5µl des im Wasserbad bei 37°C während 25 Sekunden aufgetauten Samens in eine standardisierte Messkammer (Standard Count Analysis Chambers SC 20-01-C, Leja, Nieuw-Vennep, Niederlande) gegeben und mindestens 10 Felder mittels CASA beurteilt. Die Bestimmung der Motilität erfolgte jeweils nach 10, 30 und 120 Minuten Inkubation des Samens im Wärmebad bei 37°C. Für die Auswertung wurde der Prozentsatz an total und progressiv motilen sowie schnellen (rapid cells) Samenzellen berücksichtigt.

Tabelle 1: Analyse-Einstellungen für Stierensamen.

Parameter	Settings
Frames per second	60
Number of Frames	30
Minimum Contrast	80
Minimum Size	5
Default Cell Size	5
Default Cell Intensity	70
VAP	50
STR	70
Slow Cells	Static
VAP Cut Off	30
VSL Cut Off	15
Min. Intensity Gate	0.30
Max. Intensity Gate	1.70
Min. Size Gate	0.10
Max. Size Gate	3.40
Min. Elongation Gate	8
Max Elongation Gate	97
Standard Objective	10x
Target Photometer	45-55
Field Type	Dark
Chamber Depth	20
Temperature	36

2.2. Auslieferung, Handhabung und Rückzug der Samendosen

Die Auslieferung der produzierten Pailletten erfolgte im Februar und März 2005 an die Besamungstechniker der drei Besamungsregionen Bütschwil, Mülligen und Neuenburg. In jeder Region wurden je 10 BT mit mehr als 2000 Besamungen pro Jahr zufällig ausgewählt und mit je 10 Pailletten von jedem Ejakulat beliefert. Dabei wurden die Dosen jeweils in alle Becher der Arbeitsgefässe verteilt. Je nach Region erfolgte die Auslieferung der Samendosen unterschiedlich. In Bütschwil wurde die Umlagerung der Pailletten ausschliesslich durch den Logistikmitarbeiter

vorgenommen. Dazu wurden die im Transportcontainer des Logistikmitarbeiters gelagerten Samendosen vom Hauptlager und die zu füllenden Becher der Arbeitsgefässe der einzelnen BT in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Chromstahlbecken zwischengelagert. In Mülligen und Neuenburg hingegen wurden die gelieferten Dosen samt Becher vom Logistikmitarbeiter in eine mit flüssigem Stickstoff gefüllten Styroporbox zwischengelagert. Die Umlagerung der Pailletten in die Arbeitsgefässe erfolgte jedoch durch die Besamungstechniker selber. Vor dem Auffüllen des Arbeitsgefässes erfolgte eine Messung des Stickstoffspiegels. Der regelmässige Stickstoffnachschub für die Arbeitsgefässe wurde anlässlich der Samenlieferung in 14tägigen Intervallen jeweils nach (Regionen Bütschwil und Mülligen) oder vor (Region Neuenburg) dem Bezug der Samendosen durchgeführt.

Bei jedem Besamungstechniker wurde an einem Tag die Handhabung der Samendosen beurteilt. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei der Arbeitsweise und -geschwindigkeit, ob zur Entnahme der Pailletten eine Pinzette verwendet wurde und wie hoch die Becher in den Containerhals angehoben wurden. Weitere Kriterien waren Typ und Alter des Arbeitsgefässes, die Befestigung im Auto sowie die Höhe des Stickstoffspiegels.

Nach 7-monatiger Lagerung der Samendosen in den Arbeitsgefässen der BT wurden die Pailletten im September 2005 eingesammelt. In Bütschwil erfolgte das Umlagern bei der Rücknahme der Samendosen durch den Logistikmitarbeiter, in Mülligen und Neuenburg analog zur Auslieferung durch die BT. Der Stickstoffspiegel im Arbeitsgefäss wurde wiederum gemessen und protokolliert.

2.3. Bestimmung der Samenqualität nach der Lagerung

2.3.1. Objektive Bestimmung der Motilität

Nach Lagerung der Samendosen im Hauptlager und bei den BT erfolgte die Bestimmung der Motilität wie unter 2.1.4. beschrieben.

2.3.2. Flowzytometrische Bestimmung der Akrosomintaktheit

Geräte und Geräteeinstellungen

Für die Untersuchung wurde das Durchflusszytometer FACScan™ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland), das mit einem Argonionenlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer Leistung von 15 mW ausgestattet war, verwendet. Zur Messung standen drei verschiedene Filter zur Auswahl: FL-1 (530/30 nm), FL-2 (585/42 nm) orange FL-3 (650 LP nm). Für die Datenanalyse war ein Power Mac G4-Computer (Apple Computer Inc.) an das FACScan-Gerät angeschlossen. Die Bearbeitung und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Software-Programms Cellquest™ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland).

FITC-PNA / SYTO®17 / PI – Färbung, Messung und Auswertung

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Pailletten bei 37° C aufgetaut und anschliessend bei 5 % CO₂ und 37°C während 165 Minuten inkubiert. Für die Färbung wurde das Tiefgefriersperma nach Verdünnung mit Tyrode-Medium auf eine Endkonzentration von 5 Millionen Spermien/ml gebracht. Um die Akrosomintegrität zu untersuchen wurden 500 µl dieser Spermaprobe mit 2 µl SYTO® 17 (0.5mM, Katalog-Nr. S-7579, MoBitec GmbH, Göttingen) und 5 µl FITC-PNA (100 µg/ml Aqua dest., Katalog-Nr. L-7381, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gemischt und während der letzten 5 Minuten wurden 3 µl Propidium-Iodide (PI 2.99 mM, Katalog-Nr. P-4170, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) zugegeben.

Die Proben wurden im abgedunkelten Raum 15 Min. bei 37°C in einem Wärmebad (Thermostat, Typ 5320, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Anschliessend wurden sie im Durchflusszytometer bei einer Durchflussrate von 150 bis 300 Spermien pro Sekunde gemessen. Dabei wurden die Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL-3 für die rote Fluoreszenz eingesetzt.

Die Auswertung der FITC-PNA / SYTO® 17 / PI-Färbung wurde nach dem von Krienke (2003) beschriebenen Verfahren vorgenommen. Die Spermienköpfe wurden hinsichtlich ihrer Plasmamembranintegrität und der Unversehrtheit des Akrosoms in vier verschiedene Populationen eingeteilt, wobei die Zuordnung jeweils subjektiv mit Hilfe des Analyseprogramms Cellquest™ erfolgte: Spermien mit defekter

Plasmamembran und defektem Akrosom, Spermien mit intakter Plasmamembran und defektem Akrosom, Spermien mit defekter Plasmamembran und intaktem Akrosom sowie Spermien mit intakter Plasmamembran und intaktem Akrosom.

Zur Bestimmung des akrosomalen Status der Spermien wurde FITC-PNA / SYTO® 17 / PI-Färbung nach Garner et al. (1999) mit veränderten Farbstoffmengen angewandt. Der Farbstoff FITC-PNA besteht aus *Arachis hypogaea* Lectin (PNA), das an Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt ist und der Bestimmung des akrosomalen Status der Spermien dient. Dieses Lektin bindet selektiv an die äussere Akrosommembran und emittiert nach Laseranregung grünes Licht. Der Farbstoff SYTO® 17 färbt die DNA aller Spermien und emittiert nach Laseranregung Licht im orangen Bereich. Der Farbstoff PI dient der Unterscheidung von toten und lebenden Spermien. Bei vitalen Spermien ist die Plasmamembran nur für SYTO® 17 nicht aber für FITC-PNA und PI permeabel. Spermien mit intakter Plasmamembran und intakter Akrosommembran färben sich somit nur mit SYTO® 17 und fluoreszieren orange. Kommt es bei vitalen Spermien im Rahmen der Akrosomreaktion zur Vesikulation, bindet sich FITC-PNA an die äussere Akrosommembran. Zur orangen Kernfärbung zeigen diese Spermien auch eine deutlich grün fluoreszierende Kopfkappe. Spermien mit geschädigter Plasmamembran, die aber noch Teile der äusseren Akrosommembran besitzen, zeigen durch PE eine rote Kernfärbung und durch FITC-PNA eine grüne Fluoreszenz im Bereich der Kopfkappe. Spermien deren Plasmamembran geschädigt ist und deren Akrosom völlig degeneriert oder verloren ist, lassen sich nur mit PI anfärben. Für die Auswertung wurden nur Spermien mit intakter Plasma- und Akrosommembran berücksichtigt und als akrosomintakte Spermien bezeichnet.

2.4. Non-Return-Rate

Die Non-Return-Rate 56 (NRR56) wurde als Kriterium zur Kontrolle der Qualität der eingesetzten Samendosen herangezogen und mit den wichtigsten Einflussfaktoren korrigiert (Schaeffer, 1993; Van Doormaal 1993, 1998). Die Auswertung der NRR56 jedes einzelnen BT erfolgt bei Swisshgenetics monatlich wobei jeweils der Non-Return-Code der Erstbesamungen der letzten 12 Monate berücksichtigt wird. In unsere Studie wurde die NRR vom 1. September 2004 bis zum 31. August 2005

ausgewertet und dabei die Abweichung der NRR vom Durchschnitt aller Techniker in der ausgewerteten Periode, nach Korrektur der folgenden Einflüsse verwendet: Non-Return-Code der Erstbesamung, fixer Einfluss des Besamungsmonats, Rind oder Kuh, Samenpreis, Rasse des Stieres, Rasse des angepaarten Tieres, Einfluss des Betriebes, Einfluss des Stiers, Wechselwirkung zwischen der Rasse des Stiers und der Rasse des angepaarten Tieres.

2.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm StatView 5.0 (SAS Institut, Dübendorf, Schweiz). Der Einfluss von Region, Ejakulat sowie des Besamungstechnikers innerhalb der Region auf die Motilität und Akrosomintaktheit wurde mit einer multivariaten Varianzanalyse geprüft. Zur Berechnung von Unterschieden zwischen den einzelnen Regionen wurden die Ergebnisse dem Bonferroni/Dunn post-hoc Test unterzogen. Die Überprüfung des Zusammenhangs der NRR der einzelnen Besamungstechniker und der Samenqualitätsparameter erfolgte mittels linearer Regression. Die Signifikanzschwelle wurde bei $P < 0.05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss von Region und Ejakulat

Die Ergebnisse zur Überprüfung des Einflusses der Region und des Ejakulates auf Motilität und Akrosomintaktheit sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Daraus ist klar ersichtlich, dass die Region und das Ejakulat einen signifikanten ($P < 0.05$) Einfluss sowohl auf die Motilität wie auch auf die Akrosomintaktheit der aufgetauten Spermien hatten.

Tabelle 2: Einfluss von Region und Ejakulat auf die Motilität und Akrosomintaktheit im aufgetauten Samen.

Parameter	Region P	Ejakulat P	Interaktion P
Motilität total	0.003*	< 0.0001*	0.2606
Motilität progressiv	< 0.0001*	< 0.0001*	0.1448
Motilität rapid	< 0.0001*	< 0.0001*	0.1352
Akrosomintaktheit	0.0007*	< 0.0001*	0.0770

*signifikant ($P < 0.05$)

3.1.1. Samenqualität nach Lagerung in den verschiedenen Regionen

Totale Motilität

Die durchschnittlichen totalen Motilitätswerte im aufgetauten Samen nach einer Inkubationszeit von 10, 30 und 120 Minuten bei 37°C sind in Abbildung 2 dargestellt. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten betrugen die Mittelwerte im Hauptlager unmittelbar nach der Produktion (Lager-0) 56.6%, 52.8% bzw. 42.6% und 7 Monate später (Lager-7) 53.8%, 51.7% bzw. 40.5%. Die entsprechenden Ergebnisse für die in den Regionen Bütschwil, Mülligen und Neuenburg gelagerten Dosen betrugen 50.7%, 49.1% bzw. 42.0% sowie 49.5%, 47.0% bzw. 39.7% und 51.8%, 50.2% bzw. 41.7%. Signifikante Unterschiede waren zwischen der Region Mülligen und Neuenburg sowie zwischen Mülligen und Lager-0 vorhanden.

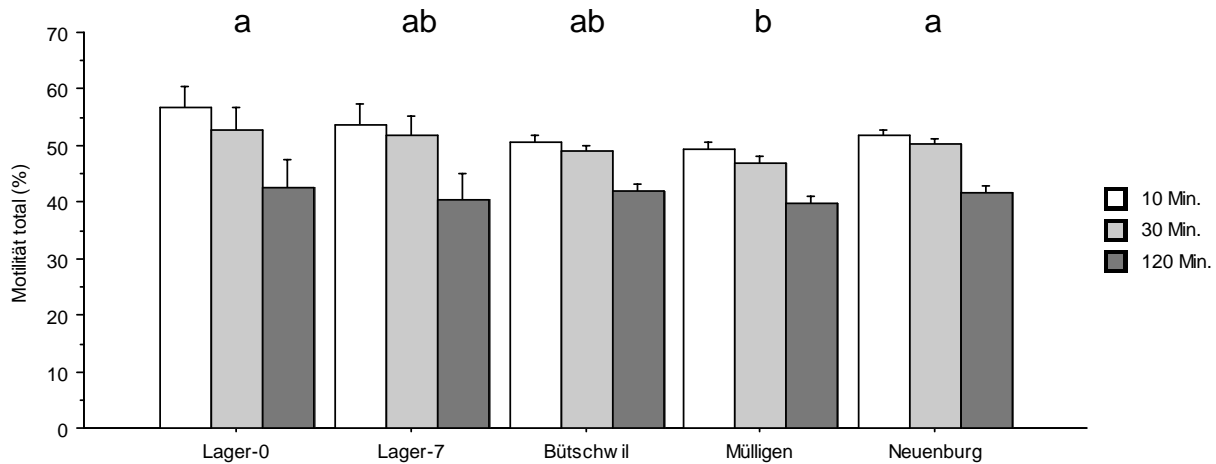


Abbildung 2: Durchschnittliche ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) totale Motilität von Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten unmittelbar nach der Produktion (Lager-0) sowie nach Lagerung im Hauptlager (Lager-7) und in den einzelnen Regionen während 7 Monaten.

Progressive Motilität

Die durchschnittlichen progressiven Motilitätswerte im aufgetauten Samen nach einer Inkubationszeit von 10, 30 und 120 Minuten bei 37°C sind in Abbildung 3 dargestellt. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten betrugen die Mittelwerte im Hauptlager unmittelbar nach der Produktion (Lager-0) 25.3%, 24.2% bzw. 14.3% und 7 Monate später (Lager-7) 23.1%, 23.0% bzw. 13.8%. Die entsprechenden Ergebnisse für die in den Regionen Bütschwil, Mülligen und Neuenburg gelagerten Dosen betrugen 21.4%, 21.0% bzw. 13.6% sowie 20.5%, 19.9% bzw. 12.4% und 21.7%, 21.6% bzw. 14.2%. Signifikante Unterschiede waren zwischen der Region Bütschwil und Lager-0 sowie zwischen Mülligen und Lager-0, Lager-7, Bütschwil und auch Neuenburg vorhanden.

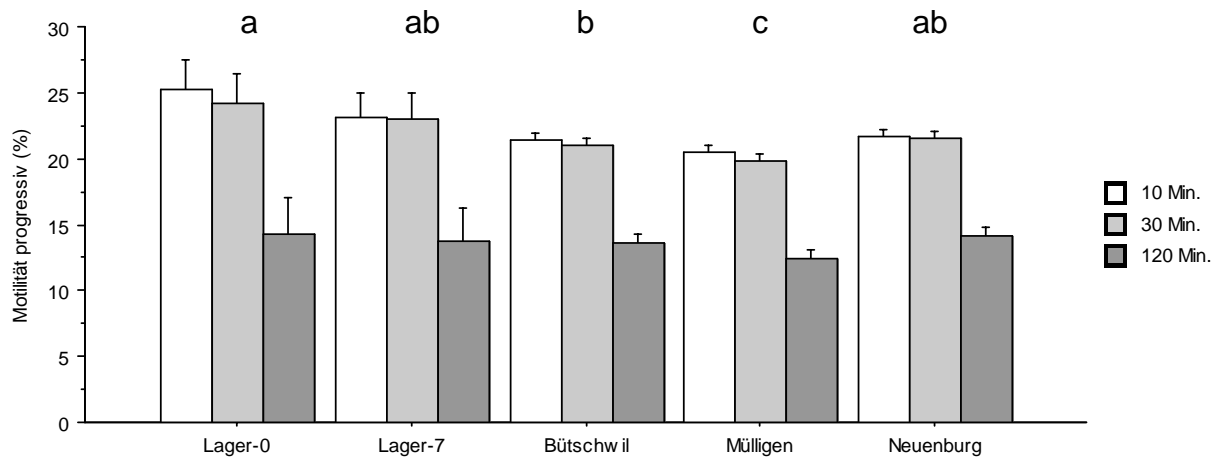


Abbildung 3: Durchschnittliche ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) progressive Motilität von Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten unmittelbar nach der Produktion (Lager-0) sowie nach Lagerung im Hauptlager (Lager-7) und in den einzelnen Regionen während 7 Monaten.

Gesteigerte Motilität

Der durchschnittliche Prozentsatz von sich schnell bewegenden aufgetauten Samenzellen nach einer Inkubationszeit von 10, 30 und 120 Minuten bei 37°C sind in Abbildung 4 dargestellt. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten betrugen die Mittelwerte im Hauptlager unmittelbar nach der Produktion (Lager-0) 44.8%, 41.7% bzw. 28.6% und 7 Monate später (Lager-7) 42.9%, 42.1% bzw. 28.0%. Die entsprechenden Ergebnisse für die in den Regionen Bütschwil, Mülligen und Neuenburg gelagerten Dosen betrugen 40.0%, 38.9% bzw. 28.6%, sowie 38.8%, 37.0% bzw. 27.0% und 41.0%, 40.0% bzw. 29.5%. Signifikante Unterschiede waren zwischen den Regionen Bütschwil und Mülligen, zwischen Mülligen und Neuenburg sowie zwischen Mülligen und Lager-0 vorhanden.

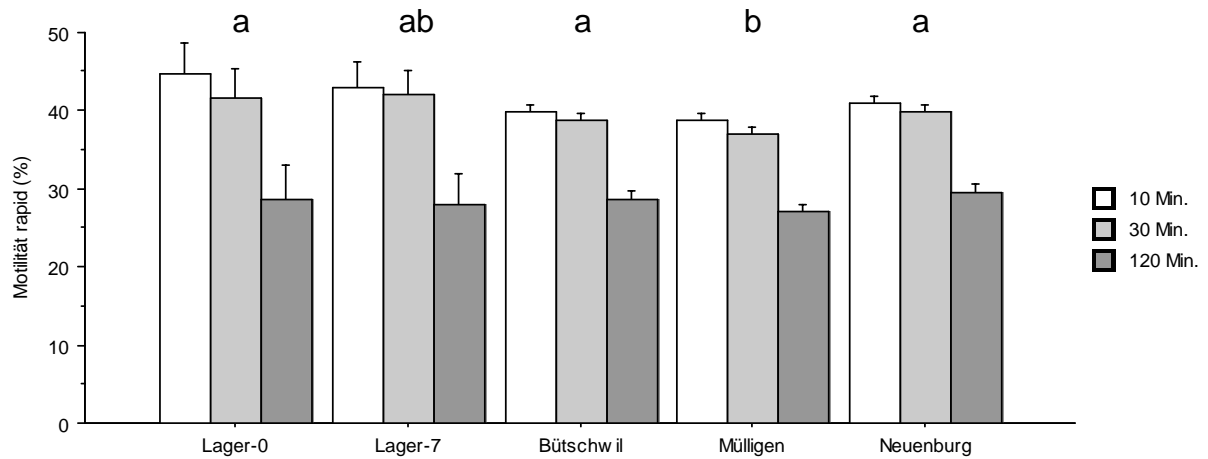


Abbildung 4: Durchschnittliche ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) Motilität von schnellen Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten unmittelbar nach der Produktion (Lager-0) sowie nach Lagerung im Hauptlager (Lager-7) und in den einzelnen Regionen während 7 Monaten.

Akrosomintaktheit

Das Ergebnis der Akrosomintaktheit (vital und akrosomintakte Spermien) der in den einzelnen Regionen und im Hauptlager gelagerten Spermien ist in Abbildung 5 dargestellt. Die durchschnittlichen Werte nach Lagerung der Dosen während 7 Monaten im Hauptlager und in den Regionen Bütschwil, Mülligen und Neuenburg waren 32.8%, 32.0%, 28.1%, bzw. 30.5%. In der Region Bütschwil konnten signifikant höhere Werte als in Mülligen beobachtet werden.

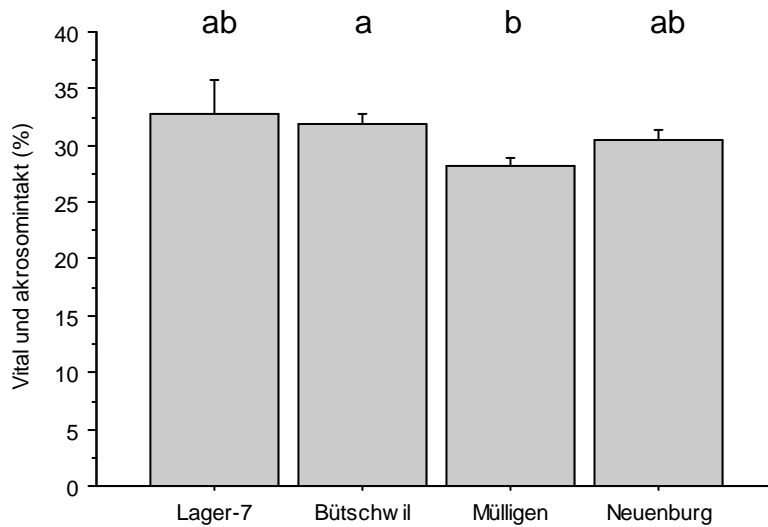


Abbildung 5: Akrosomintakte ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) Spermien nach Lagerung im Hauptlager (Lager-7) und in den einzelnen Regionen.

Die Auswertung von Motilität und Akrosomintaktheit zeigt, dass die Qualität des gelagerten Tiefgefriersamens in der Region Mülligen deutlich schlechter war als in den Regionen Bütschwil und Neuenburg.

3.1.2. Samenqualität der einzelnen Ejakulate

Die Ergebnisse der Motilität (total, progressiv, rapid) im aufgetauten Samen der zehn verschiedenen Ejakulate sind in den Abbildungen 6 bis 8 in Form von Boxplots dargestellt.

Totale Motilität

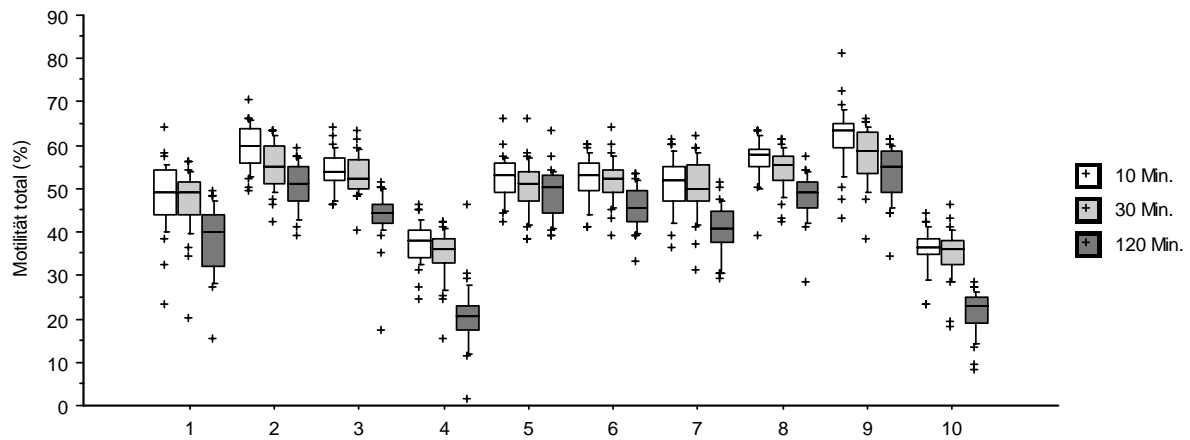


Abbildung 6: Boxplot-Darstellung der totalen Motilität von 10 verschiedenen Ejakulaten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Bei der totalen Motilität schwankten die Medianwerte nach Inkubationszeiten von 10, 30 und 120 Minuten zwischen 36.5% bis 63.5%, 36.0% bis 58.5% bzw. 20.5% bis 55.0%.

Progressive Motilität

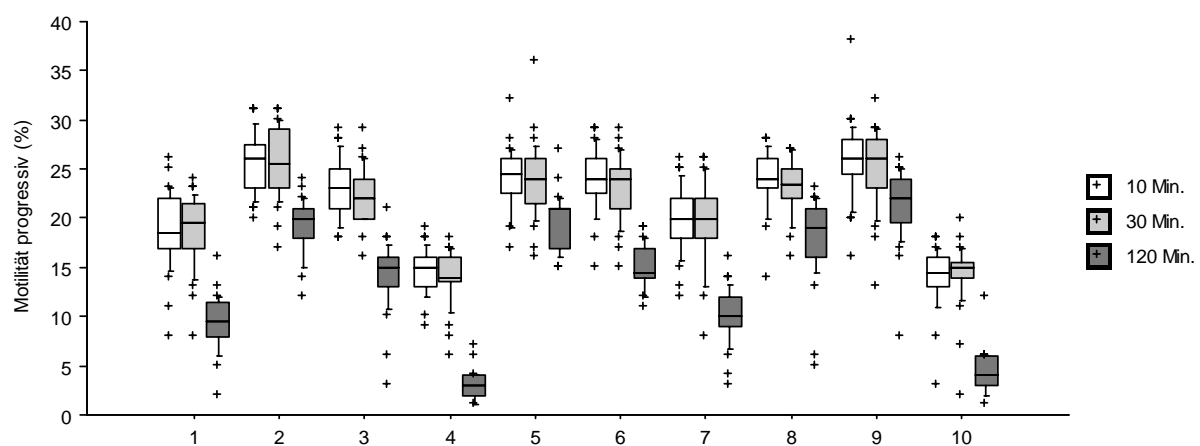


Abbildung 7: Boxplot-Darstellung der progressiven Motilität von 10 verschiedenen Ejakulaten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Bei der progressiven Motilität schwankten die Medianwerte nach Inkubationszeiten von 10, 30 und 120 Minuten zwischen 14.5% und 26.0%, 14.0% und 26.0% bzw. 3.0% und 22.0%.

Gesteigerte Motilität

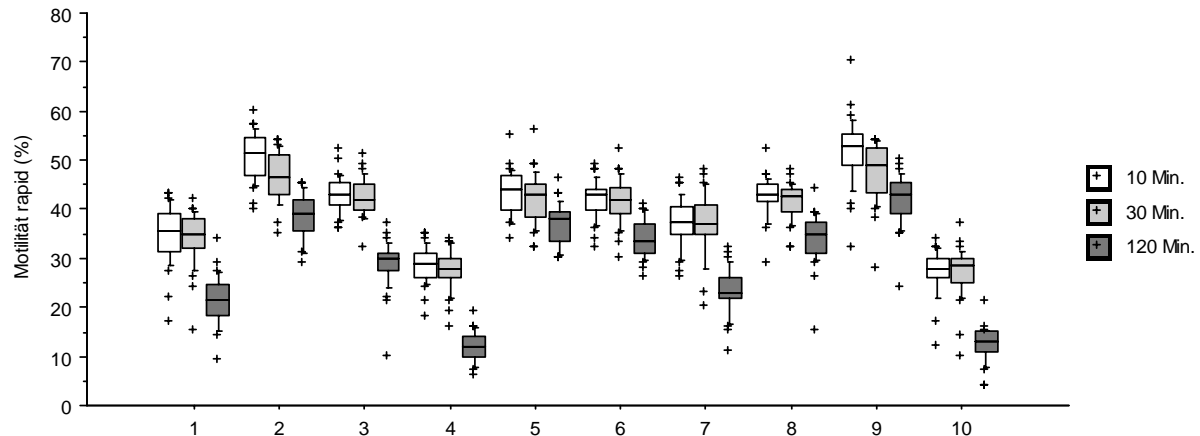


Abbildung 8: Boxplot-Darstellung der Motilität schneller Samenzellen von 10 verschiedenen Ejakulaten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Bei der Motilität schneller Samenzellen schwankten die Medianwerte nach Inkubationszeiten von 10, 30 und 120 Minuten zwischen 28.0% und 53.0%, 28.0% und 49.0% bzw. 12.0% und 43%.

Akrosomintaktheit

Der prozentuale Anteil an akrosomintakten Spermien von jedem einzelnen Ejakulat ist Form von Boxplots in Abbildung 9 dargestellt. Die Medianwerte aller Ejakulate bewegten sich zwischen 24.4 % und 36.6 %.

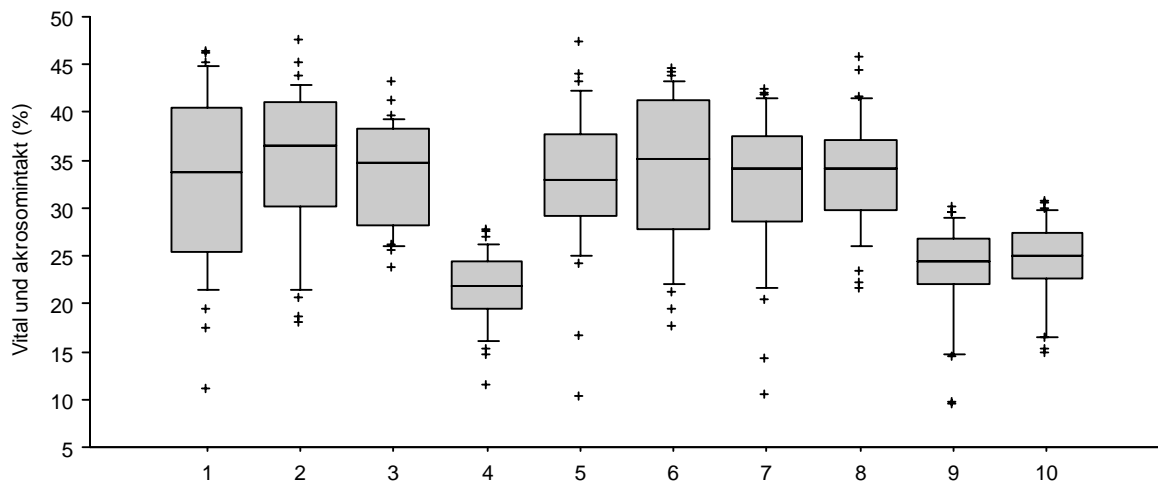


Abbildung 9: Boxplot-Darstellung der akrosomintakten Spermien von 10 verschiedenen Ejakulaten.

Beim Vergleich der Werte von Motilität und Akrosomintaktheit der einzelnen Ejakulate sind die deutlich tieferen Werte der Ejakulate 4 und 10 klar zu erkennen.

3.2. Einfluss des Besamungstechnikers innerhalb der Region

3.2.1. Bütschwil

Die Ergebnisse der Motilität (total, progressiv, rapid) von Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten der bei den einzelnen BT in der Region Bütschwil gelagerten Dosen sind Abbildung 10 bis 12 in Form von Boxplots dargestellt.

Totale Motilität

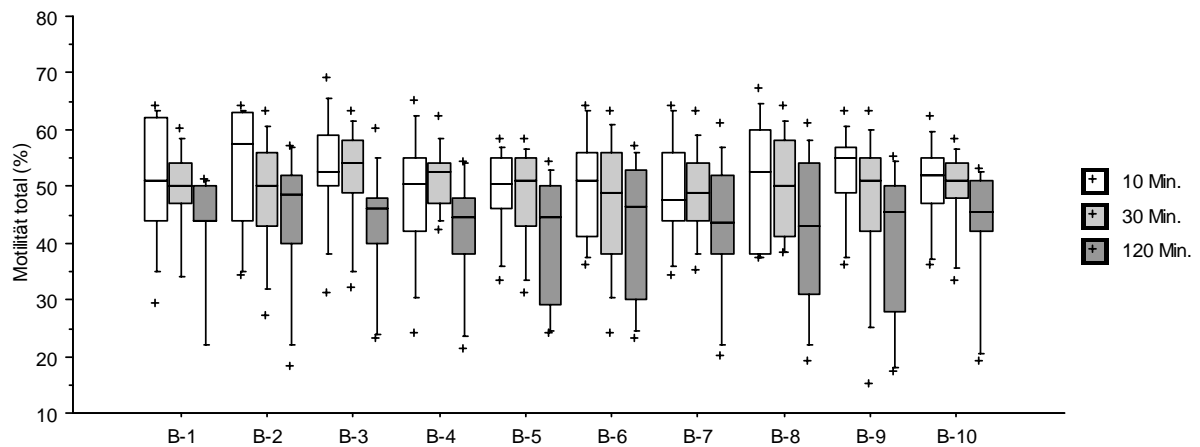


Abbildung 10: Boxplot-Darstellung der totalen Motilität von Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten der bei einzelnen BT gelagerten Dosen in der Region Bütschwil.

Die Medianwerte der totalen Motilität der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen schwankten nach den Inkubationszeiten von 10, 30 und 120. Minuten zwischen 47.5% und 57.5%, 49.0% und 54.0% bzw. 43.0% und 48.5%.

Progressive Motilität

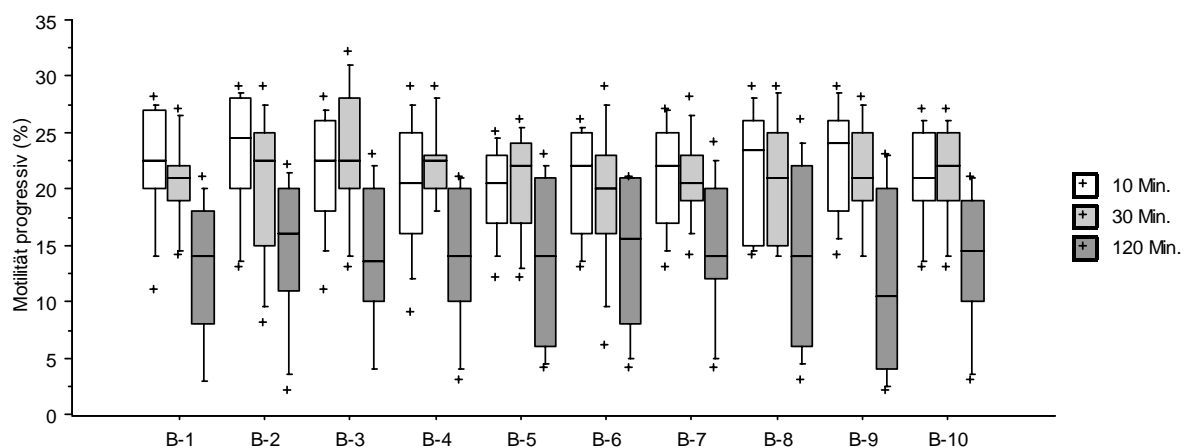


Abbildung 11: Boxplot-Darstellung der progressiven Motilität von Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten der bei einzelnen BT gelagerten Dosen in der Region Bütschwil.

Die Medianwerte der progressiven Motilität der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen schwankten nach den Inkubationszeiten von 10, 30 und 120 Minuten zwischen 21.0% und 24.0%, 20.5% und 22.5% bzw. 10.5% und 16.0%.

Gesteigerte Motilität

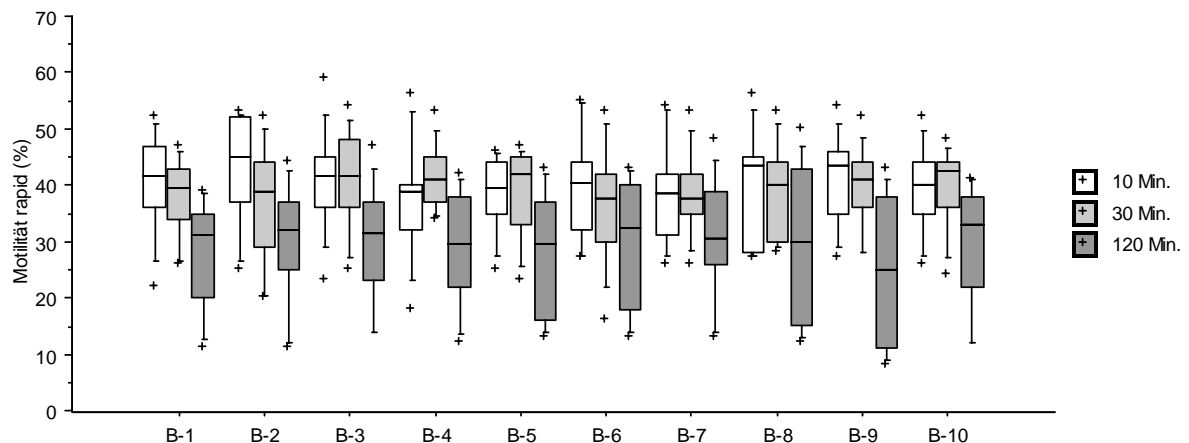


Abbildung 12: Boxplot-Darstellung der Motilität schneller Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten der bei einzelnen BT gelagerten Dosen in der Region Bütschwil.

Die Medianwerte der Motilität schneller Spermien der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen schwankten nach den Inkubationszeiten von 10, 30 und 120 Minuten zwischen 38.5% und 45.0%, 37.5% und 42.5% bzw. 25.0% und 33.0%.

Akrosomintaktheit

Die Ergebnisse der Akrosomintaktheit der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen sind in Form von Boxplots in Abbildung 13 dargestellt. Die Medianwerte von akrosomintakten Spermien der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen schwankten zwischen 29.2% und 40.7%.

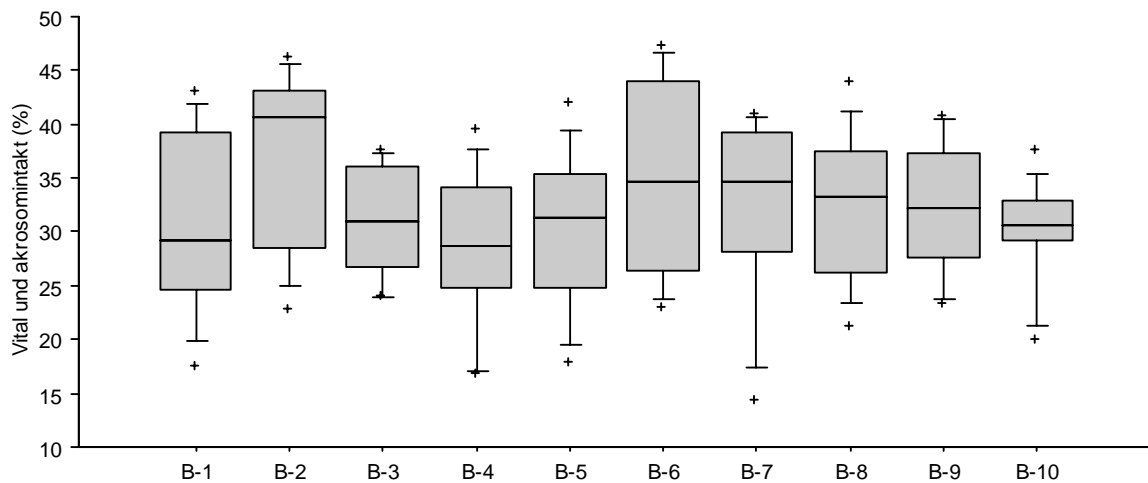


Abbildung 13: Boxplot-Darstellung von akrosomintakten Spermien der bei einzelnen BT gelagerten Dosen in der Region Bütschwil.

Innerhalb der Region Bütschwil war kein signifikanter Einfluss des BT auf Motilität und Akrosomintaktheit vorhanden.

3.2.2. Mülligen

Die Ergebnisse der Motilität (total, progressiv, rapid) von Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten der bei den einzelnen BT in der Region Mülligen gelagerten Dosen sind in Form von Boxplots in den Abbildungen 14 bis 16 dargestellt.

Totale Motilität

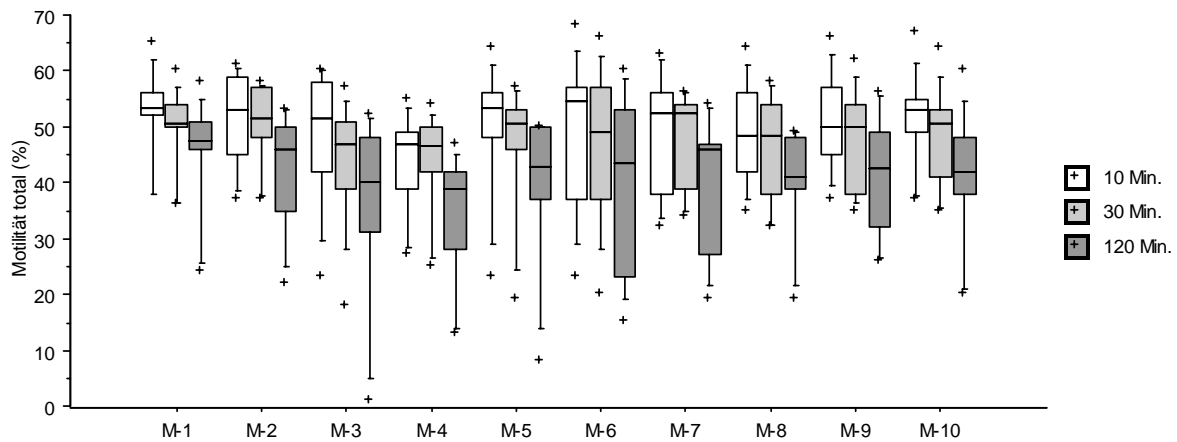


Abbildung 14: Boxplot-Darstellung der totalen Motilität von Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten der bei einzelnen BT gelagerten Dosen in der Region Mülligen.

Die Medianwerte der totalen Motilität der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen schwankten nach den Inkubationszeiten von 10, 30 und 120 Minuten zwischen 47.0% und 54.5%, 46.5% und 52.5% bzw. 39.0% und 47.5%.

Progressive Motilität

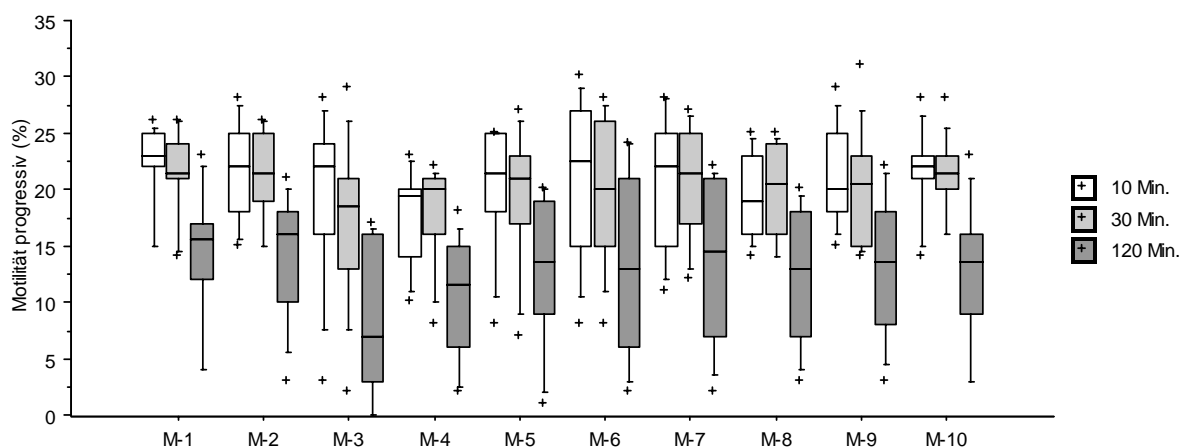


Abbildung 15: Boxplot-Darstellung der progressiven Motilität von Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten der bei einzelnen BT gelagerten Dosen in der Region Bütschwil.

Die Medianwerte der progressiven Motilität der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen schwankten nach den Inkubationszeiten von 10, 30 und 120 Minuten zwischen 19.0% und 23.0% und 18.5% und 21.5% bzw. 7.0% und 16.0%.

Gesteigerte Motilität

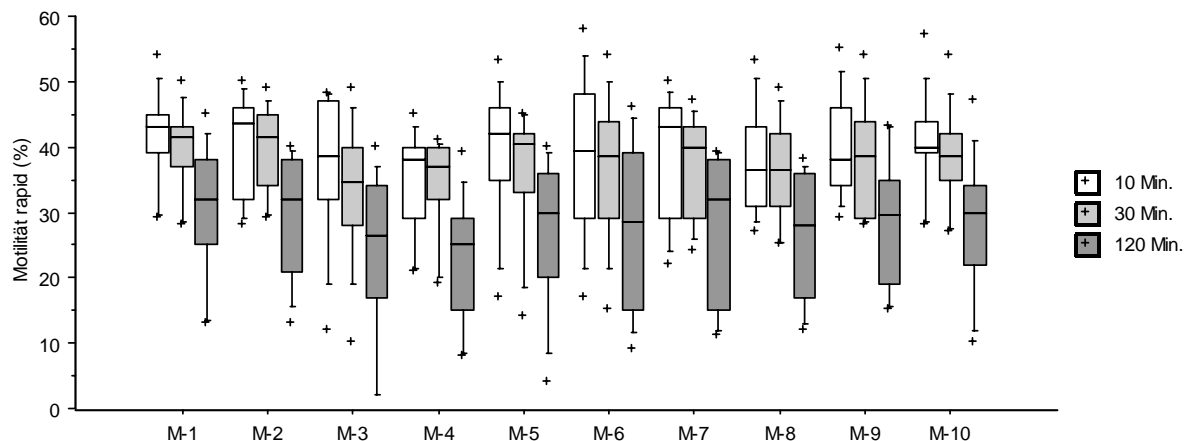


Abbildung 16: Boxplot-Darstellung der Motilität schneller Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten der bei einzelnen BT gelagerten Dosen in der Region Bütschwil.

Die Medianwerte der Motilität schneller Samenzellen der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen schwankten nach den Inkubationszeiten von 10, 30 und 120 Minuten zwischen 36.5% und 43.5%, 34.5% und 41.5% bzw. 25.0% und 32%.

Akrosomintaktheit

Die Ergebnisse der Akrosomintaktheit der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen sind in Form von Boxplots in Abbildung 17 dargestellt. Die Medianwerte von akrosomintakten Spermien der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen schwankten zwischen 21.1% und 31.3%.

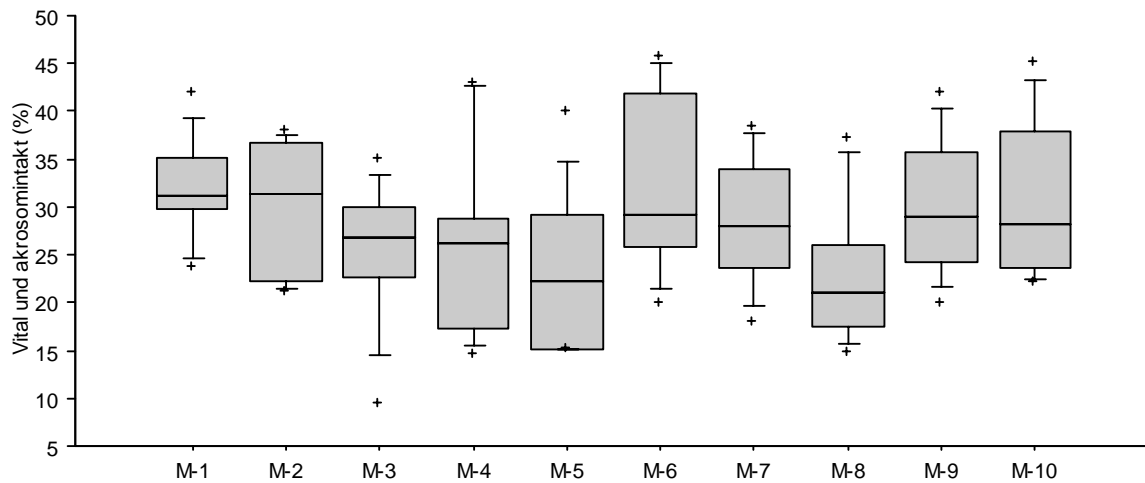


Abbildung 17: Boxplot-Darstellung von akrosomintakten Spermien der bei einzelnen BT gelagerten Dosen in der Region Mülligen.

Innerhalb der Region Mülligen war kein signifikanter Einfluss des BT auf Motilität und Akrosomintaktheit vorhanden.

3.2.3. Neuenburg

Die Ergebnisse der Motilität (total, progressiv, rapid) von Spermien der bei den einzelnen BT in der Region Neuenburg gelagerten Dosen sind in Form von Boxplots in den Abbildungen 18 bis 20 dargestellt.

Totale Motilität

Die Medianwerte der totalen Motilität der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen schwankten nach den Inkubationszeiten von 10, 30 und 120 Minuten zwischen 49.0% und 57.5%, 48.0% und 55.0% bzw. 41.5% und 50.0%.

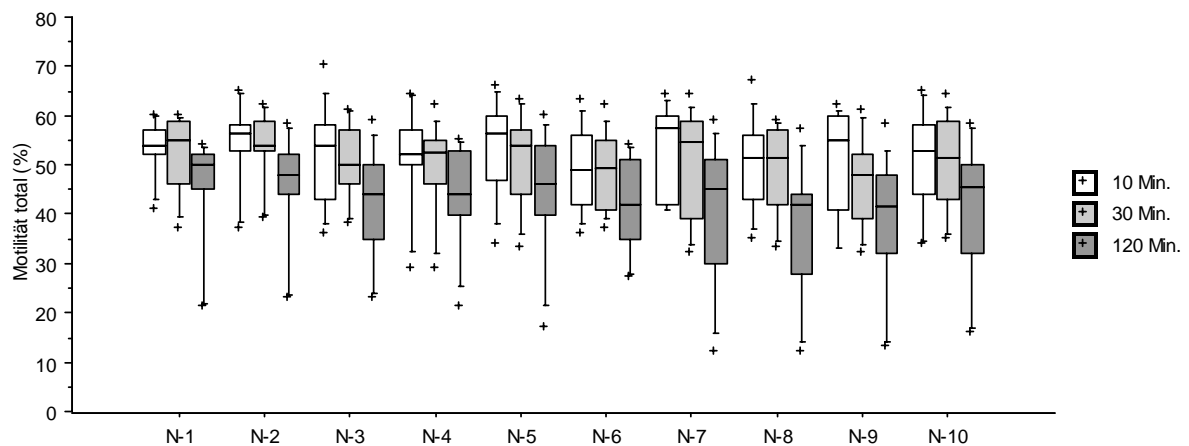


Abbildung 18: Boxplot-Darstellung der totalen Motilität von Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten der bei einzelnen BT gelagerten Dosen in der Region Neuburg.

Progressive Motilität

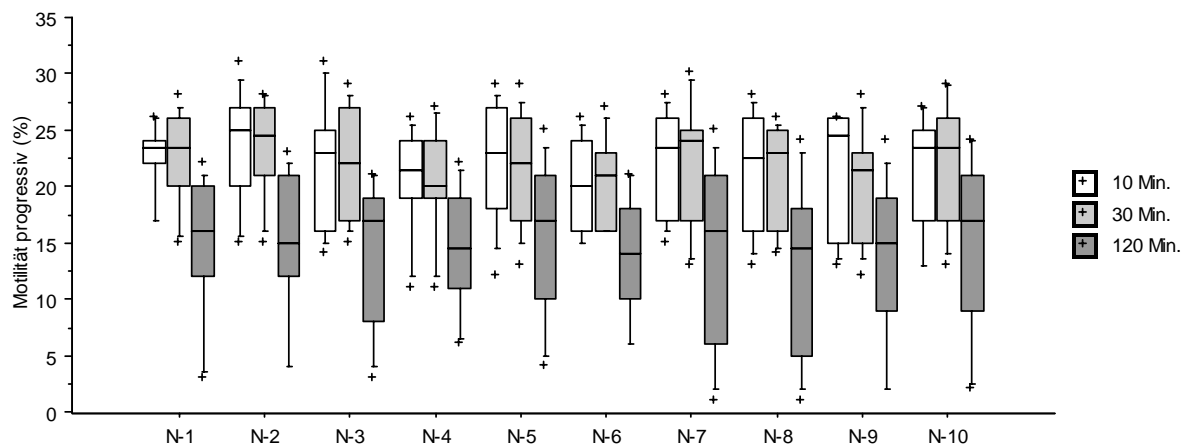


Abbildung 19: Boxplot-Darstellung der progressiven Motilität von Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten der bei einzelnen BT gelagerten Dosen in der Region Neuburg.

Die Medianwerte der progressiven Motilität der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen schwankten nach den Inkubationszeiten von 10, 30 und 120 Minuten zwischen 20.0% und 25.0%, 20.0% und 24.5% bzw. 14.0% und 17.0%.

Gesteigerte Motilität

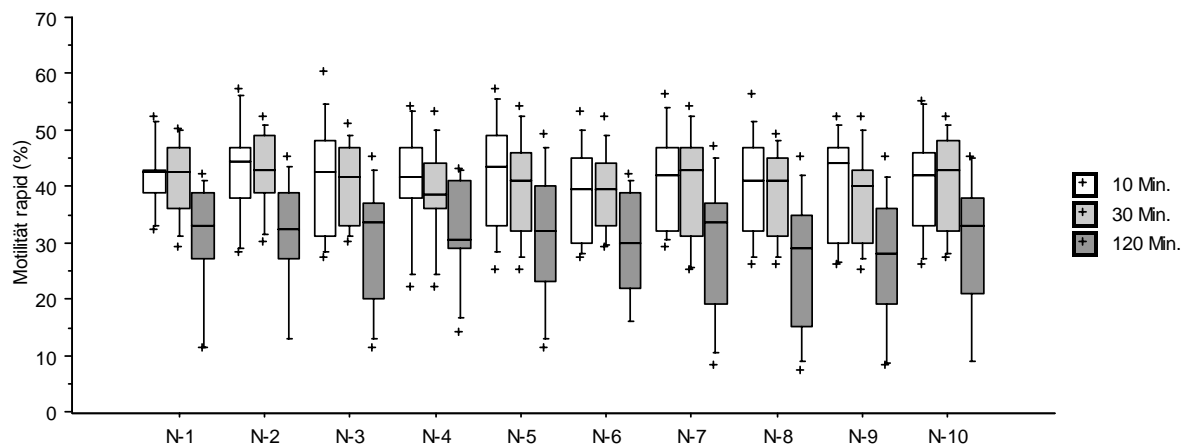


Abbildung 20: Boxplot-Darstellung der Motilität schneller Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten der bei einzelnen BT gelagerten Dosen in der Region Neuenburg.

Die Medianwerte der schnellen Samenzellen der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen schwankten nach den Inkubationszeiten von 10, 30 und 120 Minuten zwischen 39.5% und 44.5%, 38.5% und 43.0% bzw. 28.0% und 33.5%.

Akrosomintaktheit

Die Ergebnisse der Akrosomintaktheit der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen sind in Form von Boxplots in Abbildung 21 dargestellt. Die Medianwerte akrosomintakter Spermien der bei den einzelnen BT gelagerten Dosen schwankten zwischen 26.4% und 34.8%.

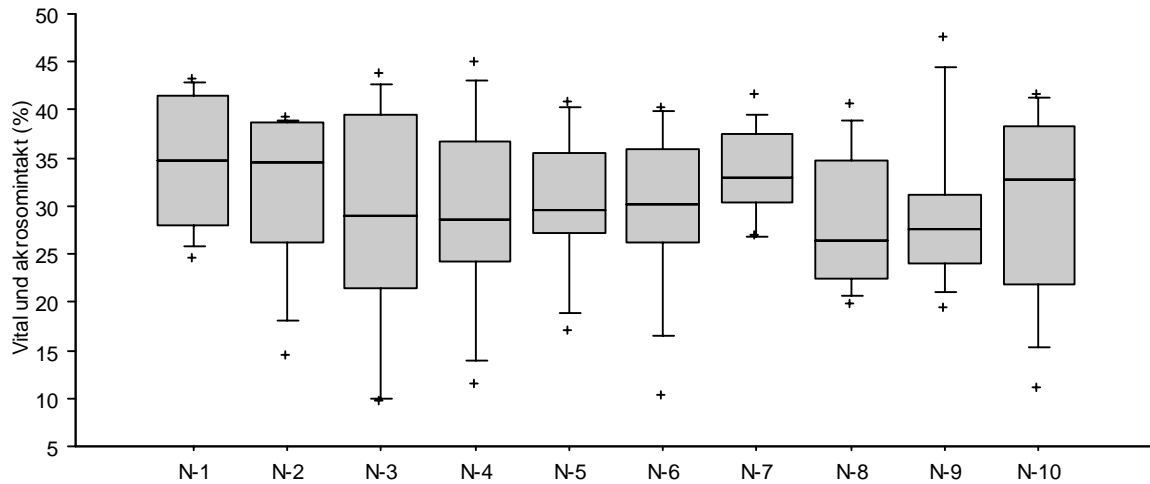


Abbildung 21: Boxplot-Darstellung von akrosomintakten Spermien der bei einzelnen BT gelagerten Dosen in der Region Neuenburg.

Innerhalb der Region Neuenburg war ebenfalls kein signifikanter Einfluss des BT auf Motilität und Akrosomintaktheit zu erkennen.

3.3. Arbeitsweise der Besamungstechniker

Die zur Kontrolle der Arbeitsweise festgelegten Kriterien sind in Tabelle 2 für alle BT in allen 3 Regionen zusammengefasst. Bei den 30 BT waren 9 verschiedene Containertypen mit einem Alter zwischen 2 und 11 Jahren im Einsatz (Ausnahme: ein 31jähriger Container). Beurteilt wurden die Arbeitsweise der Besamungstechniker, insbesondere wie schnell, ob mit oder ohne Pinzette gearbeitet und wie hoch der Becher in den Containerhals gezogen wurde. Die Messungen des Stickstoffspiegels bei der Auslieferung, beim Begleiten des Besamers sowie beim Rückzug der Samendosen schwankten zwischen 12 und 23 cm.

Tabelle 2: Informationen zur Arbeitsweise der einzelnen BT.

BT	Container		Pinzette	Paillettenentnahme		N2-Spiegel ² (cm)
	Typ	Alter		Position ¹	Geschwindigkeit	
B-1	HCL 21	1996	ja	unterhalb	sehr schnell	13.0, 12.5, 15.0
B-2	LR 26	1995	nein	bündig	sehr schnell	18.0, 17.0, 17.0
B-3	HCL 21	1995	ja	bündig	sehr schnell	13.0, 13.5, 14.5
B-4	HCL 21	1998	ja	unterhalb	sehr schnell	15.0, 14.0, 13.0
B-5	HCL 21	1996	nein	unterhalb	sehr schnell	16.0, 16.0, 15.5
B-6	HCL 21	1995	ja	unterhalb	sehr schnell	17.0, 16.5, 14.0
B-7	B 2026	2001	nein	unterhalb	sehr schnell	15.0, 15.0, 16.0
B-8	B 2026	2004	nein	unterhalb	sehr schnell	17.0, 15.0, 15.0
B-9	B 2026	2001	nein	unterhalb	sehr schnell	14.0, 15.5, 15.0
B-10	B 2026 S	1998	ja	unterhalb	sehr schnell	15.0, 23.0, 22.0
M-1	JG	2004	ja	unterhalb	sehr schnell	13.0, 12.0, 16.0
M-2	JG	2004	ja	unterhalb	sehr schnell	13.0, 13.0, 13.0
M-3	JG	2004	ja	unterhalb	sehr schnell	15.0, 13.0, 14.0
M-4	JJ	2002	nein	bündig	langsam	15.0, 14.0, 14.0
M-5	JJ	2002	ja	unterhalb	schnell	15.0, 14.0, 13.0
M-6	JJ	2002	ja	unterhalb	sehr schnell	16.0, 14.0, 16.0
M-7	JHO	2003	nein	unterhalb	sehr schnell	15.0, 14.0, 14.0
M-8	JHO	2003	ja	unterhalb	sehr schnell	15.0, 15.0, 14.0
M-9	JHO	2003	nein	unterhalb	sehr schnell	15.0, 14.0, 16.0
M-10	JHO	2003	ja	unterhalb	sehr schnell	14.0, 14.0, 13.0
N-1	HCL 21	1995	ja	unterhalb	schnell	11.0, 14.0, 12.5
N-2	B10	2003	nein	unterhalb	sehr schnell	13.0, 13.0, 14.0
N-3	B10	1995	nein	unterhalb	sehr schnell	14.0, 16.0, 15.0
N-4	B10	2003	ja	unterhalb	sehr schnell	12.0, 16.0, 14.0
N-5	B10	2003	ja	unterhalb	sehr schnell	13.0, 15.0, 14.5
N-6	B10	2003	ja	unterhalb	sehr schnell	15.0, 15.0, 14.0
N-7	S26	1975	nein	unterhalb	sehr schnell	16.0, 17.0, 16.0
N-8	B10	2003	nein	unterhalb	schnell	16.0, 15.0, 16.0
N-9	B10	2003	nein	unterhalb	sehr schnell	16.0, 16.0, 16.0
N-10	B10	2003	ja	unterhalb	sehr schnell	14.0, 14.0, 16.0

¹Position des Kanisters: bündig oder unterhalb des oberen Containerhalsrandes²N2-Spiegel: Werte bei der Auslieferung, beim Begleiten des BT und beim Rückzug der Samendosen

Bei der Begleitung der einzelnen BT konnte festgestellt werden, dass 12 von 30 BT die Pailletten ohne Hilfe einer Pinzette aus dem Kanister hoben. Bezüglich Arbeitsgeschwindigkeit arbeitete nur ein BT der Region Mülligen auffällig langsamer als seine Kollegen.

3.4. Non-Return-Rate

Zur Beschreibung des Zusammenhangs von NRR und Samenqualitätsparameter wurde eine lineare Regression durchgeführt. Für jeden Besamungstechniker wurde dafür die Abweichung der korrigierten NRR von der durchschnittlichen NRR aller BT mit den Abweichungen der einzelnen Samenqualitätsparameter vom Mittelwert verglichen.

Tabelle 3: Zusammenhang zwischen NRR und Samenqualitätsparameter.

Parameter	<i>r</i>-Werte	<i>P</i>-Werte
Motilität total		
10 Min.	0.261	0.1634
30 Min.	0.323	0.0820
120 Min.	0.413	0.0233*
Motilität progressiv		
10 Min.	0.272	0.1459
30 Min.	0.378	0.0396*
120 Min.	0.506	0.0044*
Motilität rapid		
10 Min.	0.327	0.0778
30 Min.	0.381	0.0378*
120 Min.	0.376	0.0407*
Akrosomintaktheit	0.482	0.0070*

*signifikant

Tabelle 3 zeigt, dass die progressive Motilität und die Motilität schneller Spermien nach einer Inkubationszeit von 30 und 120 Minuten sowie die totale Motilität nach

120 Minuten Inkubationszeit die NRR signifikant beeinflussten. Zusätzlich ist auch ersichtlich, dass die Akrosomintaktheit einen positiven Effekt auf die NRR hatte.

Die in Abbildung 22 dargestellten Boxplots zeigen, dass die Medianwerte der prozentualen Abweichung der durchschnittlichen NRR aller BT in den Regionen Bütschwil, Mülligen und Neuenburg 0.4, -1.9 und -0.7 betrugen. Signifikante Unterschiede waren zwischen den Regionen Bütschwil und Mülligen vorhanden.

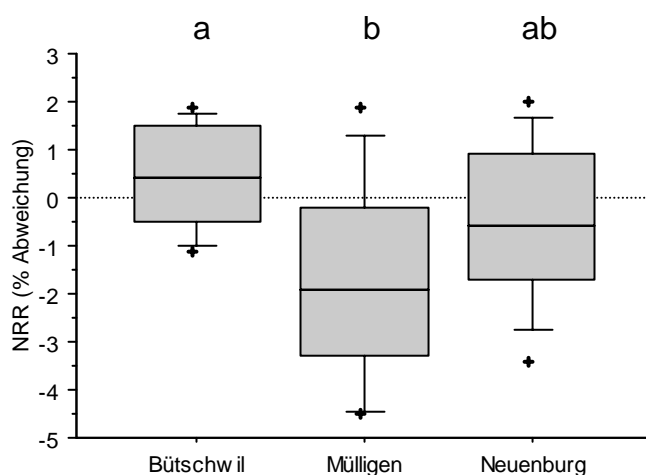


Abbildung 22: Boxplot-Darstellung der Non-Return-Raten aller BT der Regionen Bütschwil, Mülligen und Neuenburg. ^{a,b}Boxplots mit unterschiedlichen Indizes sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

3.5. Vergleich zwischen subjektiver und objektiver Motilitätsbestimmung

In Abbildung 23 sind die im Rahmen der routinemässigen Qualitätskontrolle auf der Station Mülligen subjektiv geschätzten Auftauraten von je 2 Pailletten (subjektiv-1, subjektiv-2) pro Ejakulat sowie die Ergebnisse der objektiv bestimmten Motilität (CASA) an der Universität Zürich dargestellt. Die subjektiv geschätzten durchschnittlichen Werte unmittelbar nach der Produktion lagen je nach Ejakulat zwischen 65% und 80% während die mit CASA ermittelten Werte zwischen 41% und 81% schwankten.

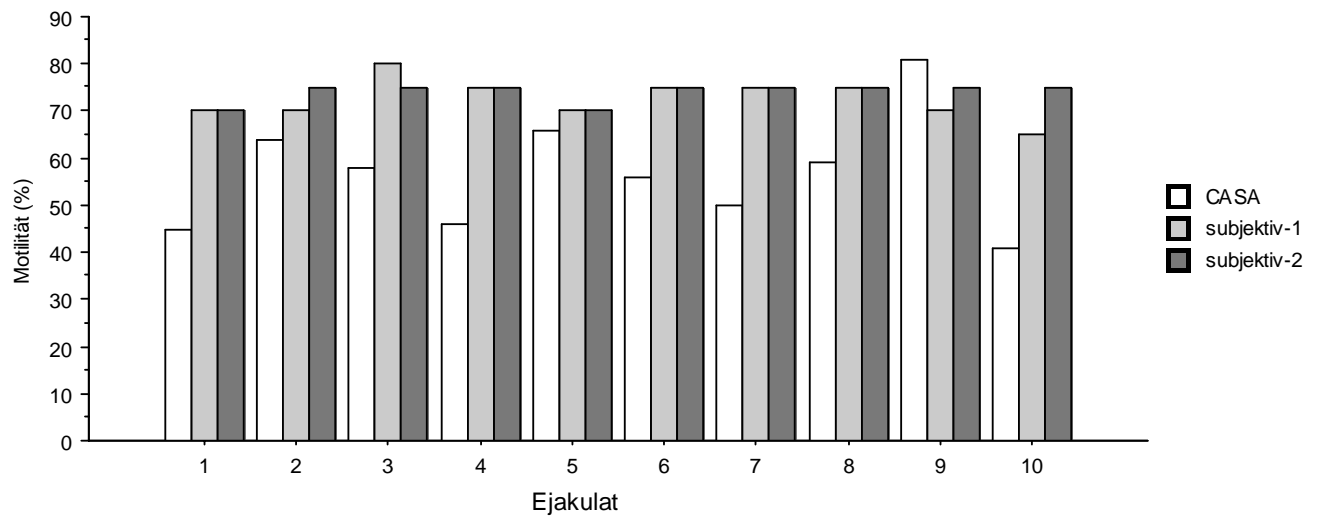


Abbildung 23: Objektive (CASA) und subjektive Bestimmung der Motilität im aufgetauten Samen unmittelbar nach der Produktion.

Die Werte der objektiv ermittelten Motilität des aufgetauten Samens waren mit Ausnahme von Ejakulat 9 immer tiefer als die subjektiv geschätzten Werte.

4. Diskussion

Unsere Untersuchungen über den Einfluss einer 7 Monate dauernden Lagerung von Samendosen im Arbeitsgefäss von BT in verschiedenen Regionen auf die Samenqualität haben gezeigt, dass zwischen den Regionen deutliche Unterschiede in der Samenqualität vorhanden waren. So wies die Region Mülligen im Vergleich zu den Regionen Bütschwil und Neuenburg bezüglich Motilität und Akrosomintaktheit signifikant schlechtere Werte auf. Als Referenzwerte dienten die Ergebnisse der im Hauptlager gelagerten Dosen. Die dort ermittelten Motilitätswerte unmittelbar nach der Produktion (L-0) waren im Vergleich zu denjenigen nach 7 monatiger Lagerung der Samendosen (L-7) nicht signifikant verschieden, obwohl die Motilität etwas geringer als bei L-0 war.

Als mögliche Ursachen für die regionalen Unterschiede kommen der nicht einheitliche Umgang mit den Samendosen sowie die unterschiedliche Handhabung der Arbeitsgefässe in Frage. In Mülligen und Neuenburg werden die Dosen mit Hilfe von stickstoffgefüllten Styroporboxen durch den BT in die Arbeitsgefässe umgelagert, während diese Arbeit in Bütschwil stets durch den Logistikmitarbeiter vorgenommen wird. Das Auffüllen der Arbeitsgefässe mit flüssigem Stickstoff erfolgt in Neuenburg vor dem Umlagern der Pailletten während dies in Mülligen und Bütschwil erst nach dem Umlagern der Samendosen geschieht. Einige BT wie auch Logistikmitarbeiter benutzen dabei keine Pinzette und lagern die Pailletten mit der Hand um. Eine Optimierung und Standardisierung der Paillettenhandhabung bei der Auslieferung ist aber für die Qualitätssicherung von grösster Wichtigkeit. Dies bedeutet, dass das Umlagern der Dosen, in ein vollständig mit flüssigem Stickstoff gefülltes Arbeitsgefäss vorzugsweise vom Logistikmitarbeiter und mit Hilfe einer Pinzette erfolgen sollte. Zudem muss der Stickstoffspiegel im Container häufig kontrolliert werden, damit eine optimale Lagerung der Pailletten im flüssigen Stickstoff bei -196°C gewährleistet ist. Bei der Paillettenentnahme sollten eine Temperaturen von minus 120°C auf keinen Fall überschritten werden. Einen Hinweis wie wichtig vorsichtiges Arbeiten ist gibt die Studie von Arbeiter (1977), der eine signifikant tiefere Samenqualität in den Sommermonaten als zu den übrigen Zeiten beobachten konnte.

Eine deutlich schlechtere Samenqualität zeigten die Ejakulate 4 und 10. Diese beiden Ejakulate wiesen bereits bei der Normfreigabe für die Paillettenproduktion eine schlechtere Qualität auf, die vor allem in den individuellen Unterschieden der Stiere zu suchen ist. Innerhalb der einzelnen Ejakulate war eine breite Streuung der Qualitätsparameter ersichtlich, am deutlichsten bei der Akrosomintaktheit.

Zwischen den Besamern innerhalb einer Region waren hingegen keine signifikanten Unterschiede ersichtlich. Die Ergebnisse zeigen aber, dass zwischen den einzelnen BT grosse Schwankungen vorhanden waren, am geringsten waren die Unterschiede bei den BT in Neuenburg. Bei einigen BT war aber auffallend, dass die Qualität eines Ejakulates immer schlechter war als diejenige der anderen, was vermuten lässt, dass sich die Dosen gerade in jenem Becher befanden mit dem unsorgfältig umgegangen wurde. Es ist aber darauf hinzuweisen, dass insgesamt nur 10 Ejakulate untersucht wurden und das geringe Zahlenmaterial keine statistische Auswertung erlaubte. Zudem muss berücksichtigt werden, dass zwischen den einzelnen Pailletten eines Ejakulates Unterschiede auftreten können und für unsere Untersuchung nur zwei Pailletten für CASA und eine Paillette für die Flowzytometrie zur Verfügung standen.

Beim Begleiten der einzelnen BT konnte festgestellt werden, dass alle über eine korrekte Einrichtung für die Befestigung des Containers im Fahrzeug verfügten. Alle Besamer hatten in der Regel anhand des Verzeichnisses der Samendosen einen guten Überblick im Arbeitsgefäss. Bei der Auslieferung wurde hingegen beobachtet, dass beim Bezug der Nachschubsamendosen nicht mit dem Aufbewahrungsverzeichnis der Dosen des Bechers gearbeitet wurde. Auch das Verzeichnis der eigenen Becher wurde nicht benutzt, sondern die BT hatten die Dosen anhand der Paillettebeschriftung gesucht. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass die Umlagerung der Dosen aufgrund eines klaren Verzeichnisses schneller durchgeführt werden kann und so Temperaturschwankungen vermieden werden können. Das Ausmass der Schädigungen der Spermien hängt vom Grad, der Dauer und der Häufigkeit der Erwärmung ab. Kupferschmied (1983) konnte zeigen, dass der Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermien in 0.25 ml Pailletten nach 1 bis 10maligem Aussetzen während 10 Sekunden an die Raumtemperatur sich deutlich verringerte. Bereits nach einmaligem Aussetzen war der Anteil um etwa 25% herabgesetzt und

bei 10maligem Herausnehmen während 10 Sekunden blieben weniger als 20% motile Spermien übrig.

Alter und Containertyp scheinen bezüglich des Stickstoffspiegels oder der Samenqualität eine untergeordnete Rolle zu spielen, da auch bei älteren Containern weder ein tieferer Stickstoffspiegel noch eine schlechtere Samenqualität festgestellt werden konnte. Der durchschnittlich tiefste Wert aller drei Stickstoffspiegelmessungen (bei Auslieferung, Begleitung und Rückzug) betrug 12.5 cm, doch auch bei diesem BT wurde keine signifikant schlechtere Samenqualität festgestellt.

Beim Vergleich der NRR56 wurde aufgrund der schlechteren Samenqualität in der Region Mülligen auch die geringste Fruchtbarkeit gefunden. Aufgrund dieses Ergebnisses muss angenommen werden, dass die Arbeitsweise des BT doch einen Einfluss auf Samenqualität und Fruchtbarkeit haben kann.

Die bei der Auftaukontrolle geschätzten Motilitätswerte in Mülligen waren mit Ausnahme von Ejakulat 9, stets deutlich höher als die mit CASA gemessenen Werte. Aufgrund der zum Teil grossen Unterschiede zwischen den geschätzten und objektiv gemessenen Auftauraten ist eine Überprüfung der in Mülligen routinemässig angewandten Methode zur Motilitätsbestimmung zu empfehlen. Als mögliche Modifikation der Auftaukontrolle wäre eine Einteilung in Kategorien (genügend/ungenügend) zu überprüfen oder die objektive Beurteilung mittels CASA einzuführen.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, die Auswirkungen der Handhabung von Samendosen durch die Besamungstechniker im Arbeitsgefäß auf die Qualität des Tiefgefriersamens zu untersuchen. Dazu wurden insgesamt 10 Ejakulate von 7 Stieren kryokonserviert und die Pailletten während 7 Monaten in den Arbeitsgefäßen von je 10 Besamungstechnikern in den Regionen Bütschwil, Mülligen und Neuenburg sowie im Hauptlager gelagert. Nach der Lagerung erfolgten die Bestimmung der Motilität im aufgetauten Samen mittels Computer-assistierter Spermienanalyse (CASA) und die Beurteilung der Akrosomintaktheit (vitale Spermien mit intaktem Akrosom) mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Zusätzlich wurden für jeden Besamungstechniker die Non-Return-Rate 56 (NRR56) berechnet und der Zusammenhang zwischen NRR der einzelnen Besamungstechniker und der Samenqualität überprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass die Region und das Ejakulat einen signifikanten ($P < 0.05$) Einfluss sowohl auf die Motilität wie auch auf die Akrosomintaktheit der aufgetauten Samendosen hatte. Die Motilität war nach Lagerung bei den Besamungstechnikern in der Region Mülligen signifikant ($P < 0.05$) tiefer als in der Region Neuenburg. In der Region Mülligen waren der Anteil akrosomintakter Spermien und die NRR signifikant tiefer als in der Region Bütschwil. Bei den einzelnen Besamungstechnikern konnte zudem ein signifikanter ($P < 0.05$) Zusammenhang zwischen Motilität bzw. Akrosomintaktheit der bei ihnen gelagerten Samendosen und der NRR festgestellt werden. Aufgrund unserer Ergebnisse kann gefolgert werden, dass die Qualität des Tiefgefriersamens signifikante Unterschiede zwischen den Besamungstechnikern der 3 Regionen aufwies und einen wesentlichen Einfluss auf die NRR hatte.

6. Summary

The aim of the present study was to investigate the influence of semen handling by different inseminators on quality of frozen-thawed bovine semen. For this study a total of 10 ejaculates were collected from 7 bulls and semen stored frozen for 7 months in vessels of 10 inseminators each, in the regions Bütschwil, Mülligen and Neuenburg. After storage motility and acrosome integrity (live spermatozoa with intact acrosomes) were measured in frozen-thawed semen by computer-assisted sperm analysis (CASA) and flowcytometry, respectively. In addition, non-return rate 56 (NRR 56) was determined for each inseminator and the relation between NRR of single inseminators and semen quality examined. Results demonstrate that motility as well as acrosome integrity of stored frozen semen were significantly ($P < 0.05$) influenced by the region and the ejaculate. After storage of straws in the region Mülligen semen motility was significantly ($P < 0.05$) lower than in the region Neuenburg. In the region Mülligen the percentage live and acrosome intact spermatozoa as well as the NRR of the inseminators were significantly ($P < 0.05$) lower than in the region Bütschwil. Motility and acrosome integrity of semen stored by single inseminators were significantly ($P < 0.05$) correlated with the inseminator's NRR. We conclude that the quality of frozen semen varied significantly between inseminators of the three regions with a clear effect on NRR.

7. Literaturverzeichnis

Arbeiter E.: Schadeinflüsse auf Tiefkühlsperma vom Rind durch Aufbewahrung und Manipulation unter Praxisbedingungen. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Wien, 1977.

Bailey J.L., Bilodeau J-F., Cormier N.: Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. J. Androl. 2000, 21: 1-7.

Braun J., Schefels W., Stolla R.: Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 1990, 103: 211-212.

Chatterjee S., Gangnon C.: Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. Mol. Reprod. 2001, 70: 708-717.

Garner D. L., Thomas C. A., Gravance C. G.: The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. Reprod. Dom. Anim. 1999, 34: 399-404.

Haugan T., Gröhn Y.T, Kommisrud E., Ropstad E., Reksen O.: Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. Anim. Reprod. Sci. 2007, 97:1-11.

Krienke M.: Evaluierung durchflusszytometrischer Verfahren zur Beurteilung der Qualität von kryokonserviertem Hengstsperma. Dissertation, Universität München, 2003.

Kupferschmied H.: Technische Weisungen zur Samenübertragung beim Rind Schweizerischer Verband für künstliche Besamung, 1983.

Leibo S.P., Semple M.E., Kroetsch T.G.: In vitro fertilization of oocytes by 37-year-old cryopreserved bovine spermatozoa. Theriogenology 1994, 42: 1257-1262.

Lessard C., Parent S., Leclerc P., Bailey J., Sullivan R.: Cryopreservation alters the Levels of the Bull Sperm Surface Protein P25b. J. Androl. 2000, 21: 700-707.

Luyet B.Y.: On the growth of the ice phase in aqueous colloids. Proc. Roy. Soc. London Series B 1957, 147: 434.

Merkt H.J., Hannig H., Bader J., Weitze K.F.: Verhalten von Bullenspermien bei der Tiefgefrierkonservierung. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 1971, 78: 127–129.

Schaeffer L.R.: Evaluation of bulls for nonreturn rates within artificial insemination organizations. J. Dairy Sci. 1993, 76: 837-842.

Uwland J.: Effect of storage time on the fertility of bull semen frozen in straws Tijdschr. Diergeneesk. 1978, 103: 763-768.

Van Doormaal B.: Linear model evaluations of non-return rates for dairy and beef bulls in Canadian A.I. Can. J. Anim. Sci. 1993, 73: 795-804.

Van Doormaal B. Review of the Canadian no-return rate system. Proc. 17th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction 1998, 14-17.

Watson P.F.: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim. Reprod. Sci. 2000, 60-61: 481-492.

Zirkler H.: Kryokonservierung von Hengstsperma mittels direktonaler Gefriertechnik in Hollow-Tubes im Vergleich zur konventionellen Gefrierung in 0.5ml Pailletten. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, 2005.

8. Dank

Hier möchte ich allen danken, die mir bei dieser Arbeit geholfen haben.

Herrn Dr. U. Witschi, Leiter der Produktion, Swissgenetics für die Betreuung des Projekts und die finanzielle Unterstützung durch Swissgenetics.

Herrn Prof. Dr. R. Thun, Klinik für Fortpflanzungsmedizin der Universität Zürich, für die Überlassung des Themas und die Hilfestellung beim Niederschreiben der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P. Wild, Institut für Veterinäranatomie, für die Übernahme des Korreferates.

Herrn PD Dr. F. Janett, Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Universität Zürich für die grosse Unterstützung, die fachliche Leitung und Betreuung während der ganzen Untersuchung.

Dr. E. Fuschini sowie allen Mitarbeitern von Swissgenetics für die Unterstützung. Stellvertretend erwähnt seien: Frau T. Schafroth, J. Kneubühler, M. Frauchiger, E. Bösch, H. Zurfluh, U. Gnägi.

Allen Besamungstechnikern für ihren Einsatz während der Versuchsphase.

Herr Dr. Frank Weber, Universität München, für die flowzytometrischen Analysen.

Herrn PD Dr. M. Hässig, Departement für Nutztiere der Universität Zürich, für die statistische Auswertungen.

9. Lebenslauf

Edith Schilter

Geboren am 17. Januar 1976 in Lauerz SZ

Heimatort: Lauerz

1983 - 1989	Primarschule Lauerz
1989 - 1992	Sekundarschule Steinen
1992 – 1995	Ausbildung zur medizinischen Praxisassistentin an der Beritschule in Luzern mit anschliessendem Praktikum bei Dr. med. N. Kamer in Arth
Feb. 1995 – Juli 1995	Stelle als med. Praxisassistentin bei Dr. med. N. Kamer in Arth SZ
Aug. 1995 – Juli 1997	Stelle als med. Praxisassistentin bei Dr. med. B. Unternährer in Ebikon LU
Aug. 1997 – Okt. 1999	Stelle als med. Praxisassistentin bei Dr. med. N. Kamer in Arth SZ
1996 – 1999	Maturitätsschule für Erwachsene in Luzern
1999 – 2004	Studium der Veterinärmedizin, Universität Zürich
Seit Nov. 2004	Assistentenstelle bei Dr. med. vet. N. Hess, Nutztierpraxis in Rothenthurm
Seit Dez. 2004	Doktorandin an der Klinik für Fortpflanzungsmedizin Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich

Lauerz, 24.1.2007

Edith Schilter